

XP-002300514

(C) WPI/Derwent

AN - 1994-268640 [33]

AP - JP19920360828 19921230

CPY - KAMA-I

DC - B02 D13 E24

FS - CPI

IC - A23K1/16 ; A23K1/18 ; A61K31/40

MC - B05-A01B B06-D18 B11-B B14-E11 D03-G01 D03-G04 D03-H E25-E01

M2 - [01] A212 A960 C710 D011 D013 D019 D023 E350 H7 H715 H722 J0 J012 J2

J251 J271 J5 J561 M210 M211 M212 M226 M232 M240 M272 M282 M283 M312

M321 M332 M342 M372 M391 M411 M511 M520 M530 M540 M630 M720 M903 M904

N161 Q212 Q213 Q214 Q220; 06561; R10075-P

M3 - [01] A212 A960 C710 D011 D013 D019 D023 E350 H7 H715 H722 J0 J012 J2

J251 J271 J5 J561 M210 M211 M212 M226 M232 M240 M272 M282 M283 M312

M321 M332 M342 M372 M391 M411 M511 M520 M530 M540 M630 M720 M903 M904

N161 Q212 Q213 Q214 Q220; 06561; R10075-P

PA - (KAMA-I) KAMATA M

PN - JP6197704 A 19940719 DW199433 A23K1/16 012pp

PR - JP19920360828 19921230

XA - C1994-122467

XIC - A23K-001/16 ; A23K-001/18 ; A61K-031/40

AB - J06197704 Prepn. of active chlorophyll cpd. comprises extrn. of crude chlorophyll from plant leaves or algae with a water-miscible organic solvent; addn. of an activating agent to give chlorophyll alpha-type cpd. and fractionation to isolate active chlorophyll cpd.

- Leaves, plants or algae are dried, pulverised and extracted with MeOH, EtOH or acetone etc.. The extract is diluted with water or a buffer to concn. of 70-80% and an activating agent (e.g. vitamin C, phenols, or a sulphur cpd.) is added to ppte. active chlorophyll. The active chlorophyll is purified by column chromatography.

- USE/ADVANTAGE - Low cost prepn. of active chlorophyll for food and esp. for feed additives.

- In an example, larvae of silk worm were fed with chlorophyll added feed for 8 days. The moulting rate was 85.5-91.6% and their body wt. ranged 31.5-35.6 g.(Dwg.0/0)

CN - R10075-P

IW - PREPARATION ACTIVE CHLOROPHYLL COMPOUND FOOD FODDER ADDITIVE EXTRACT

CHLOROPHYLL WATER MISCIBLE SOLVENT ADD ACTIVATE AGENT FRACTIONATE

IKW - PREPARATION ACTIVE CHLOROPHYLL COMPOUND FOOD FODDER ADDITIVE EXTRACT

CHLOROPHYLL WATER MISCIBLE SOLVENT ADD ACTIVATE AGENT FRACTIONATE

NC - 001

OPD - 1992-12-30

ORD - 1994-07-19

PAW - (KAMA-I) KAMATA M

RRL - 06561

TI - Prepn. of active chlorophyll cpd. for food or fodder additive - by extracting chlorophyll with water-miscible solvent, adding activating agent, and fractionating

JP6197704

Title:

PRODUCTION OF ACTIVE CHLOROPHYLL AND FEED CONTAINING ITS PRODUCT

Abstract:

PURPOSE:To provide an active chlorophyll compound having an excellent effect on bioactivities of an animal. **CONSTITUTION:**Chlorophyll a type compounds are synthesized by adding an activator such as vitamin C, phenolic acid, phenolic aldehyde or glyoxylic acid to crude chlorophyll compounds extracted from plant leaves or an algae. From the synthesized chlorophyll a type compounds, six kinds of active chlorophyll compounds each containing a pigment are isolated and extracted according to the column chromatography technique.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-197704

(43) 公開日 平成6年(1994)7月19日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 K 1/16	3 0 4 C	9123-2B		
1/18	1 0 1	9123-2B		
A 6 1 K 31/40		7431-4C		

審査請求 未請求 請求項の数2 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平4-360828	(71) 出願人	591248005 鎌田 政喜 大阪府大阪市東淀川区相川3丁目9番4号
(22) 出願日	平成4年(1992)12月30日	(72) 発明者	鎌田 政喜 大阪市東淀川区相川3丁目9番4号
		(74) 代理人	弁理士 山本 孝

(54) 【発明の名称】 活性クロロフィル化合物の生成法及びこの生成物を含む飼料

(57) 【要約】

【目的】 動物の生理活性に優れた効果を奏する活性クロロフィル化合物を提供する。

【構成】 植物葉或いは藻類から抽出した粗クロロフィル化合物にビタミンCやフェノール酸、フェノールアルデヒド、グリオキシル酸等の活性化剤を加えてクロロフィルa型化合物を作成したのち、このクロロフィルa型化合物をカラムクロマトによって6種類の色素を有する活性クロロフィル化合物にそれぞれ単離、抽出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物葉または藻類から水と任意に混和しうる有機溶媒を用いて粗クロロフィル化合物を抽出し、この粗クロロフィル化合物に活性化剤を加えてクロロフィルa型化合物を得、この化合物の各成分を分離させて活性クロロフィル化合物を得ることを特徴とする活性クロロフィル化合物の生成方法。

【請求項2】 活性クロロフィル化合物または活性クロロフィル化合物と多糖類を含んでなる飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は蚕その他の動物の飼育において、生長促進を含む種々の生理活性に優れた効果を示す活性クロロフィル化合物の生成方法と、この生成物を含む飼料に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 本願出願人は、先に、特願平3-290727号において、クロロフィルを人工飼料に入れて蚕の飼育を行えば、その生長に効果のあることを見出した。このクロロフィルは自然界において、光合成の主役として重要な機能を果たしているが、動物に対する作用としては、僅かに体内の血清及び肝臓コレステロール値の上昇を防ぐ効果のあることが観察されているに過ぎない。このとき用いられたクロロフィルとしては、Mgの入ったクロロフィルの外にFe、Cuの入ったポルフィリン化合物、さらには、クロロフィルを多量に含む植物葉、藻類など、例えば、緑茶、クロレラ、スピルリナ、ワカメ、コンブ、ホウレンソウなどにもコレステロール値の上昇を防ぐ効果があり、ラット、マウスのみならず、クロレラでは人間に対しても効果がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、これらのものは動物の体重を増加させたり生長させるには効果はなく、従って、通常のクロロフィルおよびそれを含む植物、藻類などを飼料に混合して動物に与えても生長を促進することができないとされている。例えば、蚕にクロロフィルを人工飼料に入れて与えたとき、誘因因子、嚙こう因子などの補助剤を与えなくても忌避することなく食べ、一応は大きくなるが、桑葉なみの大きさに生長させることは難しい。

【0004】 クロロフィルは植物の常成分であり、当然ながら桑だけに含まれているものでもない。ところが、本願発明者によって桑がクロロフィルで生育することが発見され、しかも、桑以外の植物で蚕が生育しにくいということは、桑に含まれる特定のクロロフィルが桑の生長に対して、効率の良い化学構造を持ち、桑には共存する生長促進物質が少ないのではないかと考えられる。

【0005】 このような点に鑑みて本願出願人は、さらに、特願平4-105630号において、桑葉に限らずクロロフィルを含む一般的な植物の代表として、学問的

な研究材料としても知られているホウレンソウを選び、藻類の代表として有用な栄養食品としても知られているクロレラ、スピルリナを材料として、これに活性化剤を作用させ、クロロフィルa型化合物を得られることを見出し、これを飼料に入れて蚕の飼育を行う時に明らかにその生長を促進し、このクロロフィルa型化合物が動物の飼育に有効であることを確認した。このクロロフィルa型化合物のようなものが動物に対して生理活性を示すことは今まで知られていない事実である。本発明は、このようなクロロフィルa型化合物からさらに研究を進めて、生長促進を含む種々の生理活性に優れた効果を示す活性クロロフィル化合物の生成方法と、この生成物を含む飼料の提供を目的とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するために、本発明の活性クロロフィル化合物の生成方法は、植物葉または藻類から水と任意に混和しうる有機溶媒を用いて粗クロロフィル化合物を抽出し、この粗クロロフィル化合物に活性化剤を加えてクロロフィルa型化合物を得、この化合物の各成分を分離させて活性クロロフィル化合物を得ることを特徴とするものである。又、飼料としては、こうして得られた活性クロロフィル化合物を単独に、または多糖類と共に他の飼料に混入してなることを特徴とするものである。

【0007】

【作用】 植物葉又は藻類などの重要な成分であるクロロフィルの成分のうち、潜在的なクロロフィル化合物を有機溶媒によって抽出し、この粗クロロフィル化合物にビタミンC、フェノール酸、フェノールアルデヒド、含硫化合物、ジオキサンなどの活性化剤を作用させると、夫々クロロフィルa型の可視部吸収帯を有するクロロフィルa型化合物が生成される。このクロロフィルa型化合物をセルロースカラムクロマト等の手段により色素の異なる複数の成分に分離して活性クロロフィル化合物を生成した。

【0008】 この活性クロロフィル化合物を含む飼料によって動物を飼育することにより、動物体内のコレステロール値の上昇を防ぎ、体質の向上を図ると共に多糖類、リグリンなどを加えた飼料を用いて動物を飼育すれば、動物の生長促進、体重増大を図り、良好な体質の動物を造り、収率の向上を図ることができる。

【0009】

【実施例】 次に、本発明の実施例を詳しく述べると、まず、ホウレンソウ、スピルリナなどのクロロフィルを含む植物、藻類をできるだけ暗所で乾燥し、抽出し易いように粉碎しておく。これに、水と任意に混和しうる有機溶媒を加え、粗クロロフィルを抽出する。溶媒としてはメタノール、エタノール、アセトンなどが使用できる。得られた粗クロロフィル抽出液に水又は適当なpH緩衝液を加え、溶媒濃度を70~80%に調節するとクロロフィル

が析出してくる。この希釈時に活性化剤を水又は緩衝液に溶かして作用させるのであるが、活性化剤としてはビタミンC、フェノール酸、フェノールアルデヒド、含硫化合物などを用いることができる。

【0010】活性化剤が溶媒に溶ける場合には、これを粗抽出液に入れて溶かしておき、これに水又は緩衝液を加えて溶媒濃度を70~80%とする。活性化剤が水溶性の場合にはそれを溶かしたときに液性が中性になるよう、予め酸又はアルカリを加えておき、それを水又は緩衝液に溶かしてから抽出液を加え、溶媒濃度を70~80%とする。析出したきた状態の液に石油エーテル、ヘキサンなどの溶媒を加えてクロロフィルa型化合物を抽出する。なお、このクロロフィルa型化合物の具体的な生成方法については本願出願人が先に出願した特願平4-105630に記載している。

【0011】こうして得られたクロロフィルa型化合物の吸収スペクトルは文献によるクロロフィルa型に酷似していた。なお、文献によるクロロフィルa型の持つ可視部吸収帯6個の位置は、 $\lambda_{\max} = 410\text{nm}$ 、 430nm 、 533.5nm 、 578nm 、 615nm 、 662nm である。このように、クロロフィルa型化合物はクロロフィルaに近いスペクトル構造を持つ種々の化合物の混合物であることが判明したので、次に、この混合物から下記に示すように各成分を分離して活性クロロフィル化合物を得、各々の活性クロロフィル化合物の有効性を検討し、その中から効力の高いのを活用して、より有効な飼料の作成を図るべく検討を進めた。

【0012】(A). 活性クロロフィル化合物のカラムクロマトによる分離。

その手段として活性化剤を作用させて得られるクロロフィルa型化合物をセルロースカラムクロマトにより、単離を行った。セルロースカラムクロマトには種々の色素、例えば青緑色、黄緑色、緑色、濃緑色、黄色、黄褐色、灰色などの色素が吸着され、夫々の部分をカットしたのち、それを溶媒で抽出し、取り出した色素の吸収スペクトルを測定した。その結果、混在してくるカロチノイドを除いて、殆どの色素は基本的にクロロフィル型の曲線を示し、これら色素化合物はクロロフィル化合物に属するものと言うことができる。

【0013】色の種類は、植物、藻類の種類と殆ど関係なく、略同じで、吸着の順序も略同じである。黄緑色（以下、YGと記す）、青緑色（以下、BGと記す）、黄褐色（以下、DYと記す）灰色（以下、PFと記す）黄色（以下、Yと記す）の順序で、時により濃緑色（以下、DGと記す）の部分が最上部にくることがある。また、スピルナ（以下、SPと記す）ではカロチノイドと思われる褐色ないし赤紅色の部分が上部に入ってくる。

【0014】ハウレンソウ（以下、HOと記す）、日本茶（以下、JTと記す）、稲（以下、STと記す）、桜（以下、CHRと記す）、桑（以下、MLと記す）、クロレラ（以下、CLと記す）、スピルナ（以下、SPと記す）など、これらの植物、藻類は活性化により、全て肉眼的に同じ色素パターン（スペクトル的には若干の差異は見られるが、）を示すことから、植物類、藻類に共通して、クロロフィルは活性化により、同じような活性化色素化合物を生成分割し、その夫々が生理活性を示すことが明らかになった。

【0015】(B). 活性化剤の種類とその特徴。

活性化剤としては、ビタミンC（以下、CNAと記す）、フェノール酸（以下、PCAと記す）、フェノールアルデヒド（以下、PALと記す）、システイン（以下、CSと記す）やメチオニン（以下、MTと記す）等の含硫化合物、さらには、グリオキシル酸（以下、GXAと記す）や焦性ブドウ酸、 α -ケトグルタル酸などのケト酸、ジケトン、グリオキサール（以下、GXLと記す）などのジアルデヒド、酢酸やグリコール酸（以下、GLAと記す）、オキシ酸-クエン酸（以下、CAと記す）、酒石酸等の脂肪酸にも活性化効果のあることを発見した。

【0016】活性化剤とpHとの関係をみると、その特徴として、植物葉または藻類から親水性溶媒を用いて粗クロロフィル抽出液をつくり、活性化剤を作用させたとき、表1に示すように、その液のpHが上昇する現象が見られる。このような塩基性物質の生成が活性化につながり、活性化剤の特徴とも言えるものである。

【0017】

【表1】活性化剤とpHとの関係。

1) MLsoln (pH6.82) 120ml			
a)	CNA+K ₂ HPO ₄ -Buffer (pH7.2)	280ml→	pH8.96
b)	PCA+ " - " (")	280ml→	" 8.62
c)	CS + " - " (")	280ml→	" 8.41
d)	PAL+ " - " (")	280ml→	" 8.64
e)	MT + " - " (")	280ml→	" 8.31
f)	GXA+ " - " (")	280ml→	" 8.66
g)	GXL+ " - " (")	280ml→	" 9.31
h)	GLA+ " - " (")	280ml→	" 8.40
i)	CAK+ " - " (")	280ml→	" 9.22
2) HOsoln (pH7.32) 120ml			
a)	CNA+ " - " (")	280ml→	" 8.76
b)	PCA+ " - " (")	280ml→	" 8.78
c)	CS + " - " (")	280ml→	" 8.62
3) SPsoln (pH8.81) 120ml			
a)	CNA+ " - " (")	280ml→	" 8.98
b)	PCA+ " - " (")	280ml→	" 8.72
c)	MT + " - " (")	280ml→	" 8.42
4) CLsoln (pH7.23) 120ml			
a)	CNA+ " - " (")	280ml→	" 8.68
b)	PCA+ " - " (")	280ml→	" 8.52
c)	MT + " - " (")	280ml→	" 8.38
d)	CS + " - " (")	280ml→	pH8.46

【0018】(C). 活性クロロフィル化合物の性状。

各種材料のクロロフィルを活性化して得られた活性化クロロフィルを分割して得られた6種類の色素について吸収スペクトルを測定し、そのスペクトルを色素別に整理して、色素の性状について検討を試みた。

【0019】(1). BG、クロロフィルの原料として、M 40 L、HO、CL、SP、JT、STなどの植物、藻類の広い範囲に亘って異なる原料を使用し、活性化剤として種類の異なるCNA、PCA、PAL、MT、CSなどを加え、生成した活性化物BGについて吸収曲線を測定した結果、殆どのものが同じ位置に吸収極大を持ち、吸

収曲線も同じで、生成した活性クロロフィル化合物が原料、活性化剤の種類に関係なく、同性質の活性物質を生成できることを示している。しかも、生成した活性化物の吸収曲線のクロロフィルa型化合物のそれとも異なった吸収曲線である。このことは、今までに知られていなかった新しい型のクロロフィルが生成したことを示している。このML-CNAのBGについて、文献値およびクロロフィルa型化合物の吸収曲線の比較を行ってみると表2のようになる。

【0020】

【表2】

CHL-a	極大値 (nm)							
文 献 値	662.0	615.0	578.0	533.0	—	—	430.0	410.0
a型化合物	663.0	613.0	—	534.5	—	453.5	429.5	415.0
活性化物	663.0	614.0	579.0	534.0	505.0	—	(430.0)	415.0

【0021】活性化物の極大値の位置はクロロフィルaの文献値とよく似ているが、文献値およびa型化合物には、505.0nm 付近の極大がなく、活性化物だけに505.0nm の極大値がある。この極大値の出てくるのが大きな特徴で、この極大値は原料植物、藻類の種類にも関係なく、活性化剤の種類が変わっても変動はなく、このことから505.0nm の極大値は活性化物BGの特性値の一つで、410.0nm、430.0nm、578.0nm、615.0nm、662.0nmなどの極大値と並んだ青緑色—クロロフィル—BGの特性値である。これらBGの特性値のうち、425.5～430.5nmの特性値は、ML—CNA、PCAおよびSP—CSだけが持つもので、他のBGではこの極大値は見ら*

*れない。なお、活性クロロフィル化合物の中でBGの含有量は最も多く、活性も強い。

10 【0022】(2).DYは黄褐色物質で、緑色のクロロフィルとは異なるように見えるが、スペクトル的にはクロロフィル型の吸収曲線を示し、BGと同様、植物及び藻類の種類、活性化剤の種類に関係なく、粗クロロフィル抽出液に活性化剤を作用させ、分離、抽出して得られる活性化物である。その吸収スペクトルを他のクロロフィルと比較してみると表3のようになる。

【0023】

【表3】

クロロフィル —a (nm)	BG (nm)	DY (nm)		BGR (nm)
		藻類	植物	
662.0	663.0	668.0	668.0	668.0
615.0	614.0	610.0	610.0	610.0
578.0	579.0	567.5	—	—
533.5	534.0	534.0	534.0	534.0
—	505.0	—	504.0	499.0
—	—	476.0	473.5	473.0
430.0	(430.0)	—	—	—
410.0	415.0	410.0	410.0	410.5

【0024】即ち、473.5nm 付近、および567.5nm または473.5nm 付近にDY特有の吸収帯が現れ、このうち473.5nm の吸収帯は藻類、植物に共通して現れるが、567.5nmは藻類の場合にのみ、473.5nm は植物の場合にのみ夫々現れる。その他の吸収帯は、多少の位置の変動はあっても、クロロフィル共通の吸収帯である。このようにDYは植物、または藻類に活性化剤を作用させて得られるクロロフィル混合物（クロロフィルa型化合物）から吸着、分離することによって得られるが、その生成量は少なく、活性化剤を変えてグリオキシル酸を用いたときには、DY生成量が多い活性化物が得られる。

【0025】(3).BGRは、BGを再び溶媒に溶かした後、セルロースに再吸着し、さらに溶媒で溶出したときに得られる活性化物で、その吸収曲線は上記表3に示すようにDY—植物に近い。但し、このBGRでは藻類と植物との区別はなく、同一の吸収を示す。DYは含有量

が少ないので、含有量の多いBGを利用してBGRを作り、DYの代用をさせる事もできる。

40 【0026】(4).DGは深緑色とも言えるもので、常成分として存在はしていないが、活性化物生成のときに出来てくる。カラムの最上部に吸着され、展開溶媒で溶出されないので吸着部分をカットしてから溶出させる。下記の表4に示すように吸着部位はYGと異なるが、そのスペクトルはYGと良く似ており662nm、614nm、535nm、454nm、430nm、412nmなどを主吸収にしている。

50 【0027】(5).YGは黄緑色の吸着され易いクロロフィル様色素である。このスペクトルで特徴のあるのは、表4に示すようにDGと同じく450nm 付近に極大が現れることで、この450nm 以外に664nm、615nm、534nm、410nm に基幹吸収があり、このほか、規則性に乏しいが植物では644nm、595nm、430nm 付近に、藻類では470nm、560nm 付近に異なる吸収が現れる。

【0028】(6). Yは黄色色素で、同じくクロロフィル様色素である。このものも表4に示すようにDYと同じく藻類では567nm 付近に吸収があるが、植物ではその吸収がなく、YGと同じく、活性化剤の種類により、その他の吸収の位置が不規則で同じ植物でも活性化剤の種類*

*により若干異なったものが生成することがある。

【0029】

【表4】下記表において括弧内に示す数値は化合物の主なもの数値で、植物、藻類、活性化剤の種類などにより変動することがある。

クロロフィル -a (nm)	DG (nm)	YG (nm)		Y (nm)
		藻類	植物	
662.0	662.0	662.0	665.0	668.5
—	—	644.0	—	—
615.0	614.5	612.0	610.0	610.0
—	—	597.0	—	—
578.0	578.0	—	—	(567.0)
533.5	534.0	534.0	533.0	534.0
—	—	(504.0)	(504.0)	(504.0)
—	454.0	454.0	454.0	(448.5)
430.0	430.0	428.0	—	—
410.0	410.5	411.0	411.0	410.0

【0030】以上のように、クロロフィルa型化合物に活性化剤を作用させることにより、6種類の異なるスペクトルを持つクロロフィル化合物が得られ、それぞれ異なった吸収曲線が得られた。このことは、異なった化学構造を持つ6種類のクロロフィル化合物が活性化剤の作用によって生成され、この活性クロロフィル化合物は構造の差異（スペクトルの差異）により活性に強弱の差異はあるが、いずれも生理活性をもっている。その中ではBGの効果が強く、なかでも430nm 付近に極大を持つものは効力が強い。

【0031】(D). 活性クロロフィル化合物の生理活性。活性化剤を作用させ、分離することにより得られた6種類の活性クロロフィル各々について、これらのものを混合した飼料を用いて蚕を飼育した結果、いずれのものも順調な成育を示した。しかしながら活性には若干の差が見られ、BGはもっとも良く、DG、DY、BGRも順調で、Y、YGのうち、特にYGは溶解度の関係からか、飼料がバサバサの感じで成績がやゝ落ちる。これら活性クロロフィルのうち、DYのように外観的には黄褐色（スペクトル的にはクロロフィル様の曲線を持っているが）のものが成長を良くし、体重を増加させる効果の有ることは余り知られていない。よく似た曲線を持つBGRについても同様である。

桑葉末

スピルリナ（科葉）

クロレラ粉末（クロレラ食品）

ホウレンソウ

【0031】この活性クロロフィルの場合も、クロロフィルa型化合物と同様、多糖類との共同効果が見られ、飼料の食下を良くし、飛び抜けた個体の体重増加よりも、揃ってよく食べる効果として生存率を良くし、平均的な体重増加、収量の増加がみられる。これに使用した多糖類は種々の材料を有機酸を含む水で加熱分解したのち、メタノールなどの溶媒を加え析出させて得られるものばかりでなく、ペクチン、アルギン酸、ヘミセルロースなどの多糖類が使用できる。材料としては茶、桜、桑など一般的な植物の葉のほか、藻類、例えばクロレラ、スピルリナ、ワカメ、コンブなどの粉末、米、麦などのはい芽、大豆、綿実などの脱脂粉末、おから、アルファルファなど草類の粉末なども用いられる。分解に使用する有機酸としては、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、マレイン酸などを用いることができる。

【0032】この活性クロロフィルのうち、BG、DG、DYなど効果の良いものを用い、これを飼料に混合し、植物を飼育することにより、動物体内のコレステロール値の上昇を防ぎ、体質の向上、体重の増加を図るとともに多糖類などを同時に飼料に混合して収量の増大を図ることができる。以下に本発明の具体的な実施例に基づいて説明する。

【0033】本発明には次のような材料を使用した。

京都工芸繊維大学農場より分譲

発売元 KK科葉

発売元 KK末広酵素研究所SB

市販品

稲葉

農家より分譲

製茶(有機栽培煎茶)

宇治 共栄製茶

活性化剤としては次のものを使用した(いずれもナカライテクスKKより購入)

ビタミンCナトリウム塩(CNA)

プロトカテキユ酸(PCA)

プロトカテキユアルデヒド(PAL)

システイン(CS)

メチオニン(MT)

グリオキシル酸(GXA)

グリオキサール(GXL)

グリコール酸(GLA)

クエン酸(CA)

なお、吸収スペクトルの測定は島津製作所UV2100型測定器で行った。

【0034】活性クロロフィル作成に当たっては、まず、クロロフィルa型化合物を作成した。即ち、植物または藻類からメタノールなどの親水性溶媒でクロロフィルを抽出し、この粗クロロフィル抽出液に水を加えて希釈すると同時に活性化剤を作用させてクロロフィルa型化合物を含む液を作り、これを石油エーテルまたはヘキサンなどの溶媒に転溶させる。次に吸着する場合にはその溶液をそのまま、又、その溶媒を溜去すればクロロフィルa型化合物を取ることができる。活性化剤としては

【0035】実施例1

上記の方法によって得られたクロロフィルa型化合物をセルロースカラムクロマトグラフィーによる方法(林孝三編:植物色素230~235頁(1988)養賢堂発行)で混合物の分離、精製を行った。セルロースにはセルロースパウダーMN100(ナカライテクスKK)を使用した。

反応の終わったクロロフィルa型化合物(混合物)の石油エーテル溶液を、溶媒を溜去せずにそのまま、予め用意したセルロースカラムに、器壁に沿って静かに入れ吸着を行う。セルロースカラムはガラス製の吸着カラムに

セルロースMN100を少量づつ充填し、これに石油エーテルを気泡の入らぬように注入し、さらに木棒を用い、攪拌して気泡を十分に追い出す。これに吸着を行うクロロフィルa型溶液を注入し、その大部分がカラムに入ったところで、器壁に沿って石油エーテルを加え展開を行う。

【0036】展開が進むに従い、活性化物(色素)で最初に吸着されるのはDGであるが、このDGは他の色素と異なった挙動を示し、セルロースの目を塞いで吸着液の流下を防げるので、時々攪拌して流下を促進させる必要がある。DGに次いでカロチン、YG、BG、DY、Y、フェオフィチンの順に吸着され、さらに石油エーテルを加えて展開を続けると、フェオフィチンから順にY、DY、BGが順次、流下してくる。そこで、これらの色素を順次分けて取り、夫々の色素毎に集め、溶媒を除去して目的の活性クロロフィルが得られる。試料が少量の時は、吸着後に吸着柱を静かに取り出し、各色素の吸着部分を削り分けた後、夫々を溶媒で抽出し、目的の活性化物を取り出す。こうして得られた活性化クロロフィルおよび元の混合物であるクロロフィルa型化合物の吸収スペクトルを測定し、その結果を表5~表11に示した。

【0037】

【表5】

ML-CNA	663.0	613.0	—	534.5	—	—	453.5	429.5	412.0
-PAL	664.0	613.0	—	534.0	—	—	452.0	429.0	412.0
-PCA	664.0	613.5	—	534.0	—	—	450.5	427.5	411.0
-GXA	668.5	609.5	—	533.5	—	472.5	—	—	410.5
-GXL	665.0	611.5	—	534.5	—	—	453.0	^	411.0
-CA	666.5	610.5	—	534.0	—	—	453.0	^	410.5
-GLA	667.7	609.0	—	534.5	—	—	452.5	—	410.5
-CS	663.0	612.5	580.0	534.0	—	—	^	430.0	411.0
-MT	664.5	—	—	534.0	—	—	452.0	428.0	411.0
HO-CNA	661.0	—	575.5	533.0	—	—	—	429.0	^
-PCA	663.5	612.5	578.5	533.0	—	—	451.0	429.0	410.5
-PAL	663.5	611.5	579.0	534.5	—	—	453.0	430.0	411.0
-CS	664.0	613.0	578.0	534.0	—	—	—	429.0	411.0
-MT	663.0	614.0	579.5	534.0	—	—	452.5	430.0	411.5
CL-CNA	665.5	611.5	—	533.5	—	—	—	—	411.5
-PCA	662.0	613.5	—	532.5	—	—	—	429.5	412.5
-PAL	662.5	615.0	579.5	532.5	—	—	—	428.5	413.0
-CS	662.0	615.5	580.0	533.5	—	—	—	428.5	413.0
-MT	662.0	616.0	580.0	532.5	—	—	—	429.5	413.0
SP-CNA	663.0	614.0	575.0	533.0	—	473.0	—	429.0	411.5
-PCA	662.0	613.5	576.0	—	—	476.5	—	—	^
-PAL	662.5	613.0	575.5	531.5	—	476.5	—	420.5	^
-CS	667.5	610.0	—	534.5	503.0	—	—	—	411.0
-MT	662.0	614.5	577.0	530.0	—	477.0	—	429.0	^
JT-CNA	667.0	609.5	—	534.5	—	—	452.5	—	411.0
ST-CNA	662.0	613.0	—	533.5	—	—	453.0	429.0	413.0
CHRCNA	667.5	609.5	—	532.5	—	—	448.0	—	412.5

クロロフィルa型化合物の吸収極大値 (nm)

* 活性クロロフィル化合物の吸収極大値 (nm)

[0038]

(1). 青緑色 (BG)

[表6]

*

ML-CNA	663.0	614.0	579.0	534.0	505.0	—	429.5	410.5
-PCA	662.5	615.0	577.5	534.0	501.5	—	430.0	410.5
-PAL	665.5	611.5	—	534.5	—	—	—	410.5
-MT	668.5	—	—	534.0	504.0	—	—	410.0
-CS	662.5	611.0	—	534.0	504.5	—	—	410.0
HO-CNA	665.0	612.5	576.0	534.5	506.0	—	^	410.0
-PCA	664.0	612.0	^	534.0	504.5	—	—	411.0
-MT	668.0	610.0	—	533.0	504.0	—	—	411.0
-CS	665.0	612.0	577.0	534.0	505.0	—	—	410.0
CL-CNA	665.0	611.5	569.0	534.5	505.0	—	—	410.5
-PCA	667.0	—	—	532.5	501.5	—	—	407.0
-PAL	665.5	609.5	—	533.0	502.0	—	—	409.0
-MT	668.5	609.5	—	534.0	503.0	—	—	410.0
-CS	667.0	610.0	—	532.0	502.5	—	—	407.0
SP-CNA	666.5	611.0	—	534.0	504.5	—	—	411.0
-PCA	665.0	610.0	—	534.5	504.5	—	—	412.0
-PAL	665.0	610.5	—	534.0	505.0	—	—	411.5
-MT	668.0	610.5	—	533.0	504.0	—	—	^
-CS	662.0	616.0	578.0	531.5	—	—	430.5	411.5
JT-CNA	668.0	608.5	—	534.5	505.0	—	—	411.0
ST-CNA	668.0	609.0	—	533.5	505.0	—	—	409.0
CHRCNA	668.0	608.0	—	533.0	504.5	—	—	411.0

[0039]

[表7] (2). 黄緑色 (YG)

ML-CNA	662	—	612	—	—	534	—	—	453	428	411
-PCA	662	—	614	—	—	535	—	—	454	430	—
-MT	668	646	607	—	—	534	505	—	452	432	411
-CS	664	644	612	—	—	534	504	—	454	427	411
HO-CNA	665	644	—	596	—	—	—	—	454	428	—
-PCA	665	644	—	598	—	535	—	—	454	428	—
-MT	—	645	—	598	—	—	—	—	454	430	—
-CS	—	644	—	597	—	—	—	—	454	431	—
CL-CNA	663	—	—	—	570	533	—	—	—	—	—
-PCA	667	—	—	—	—	532	—	471	450	—	413
-MT	668	—	610	—	—	533	—	470	450	—	411
SP-PCA	665	—	610	—	—	534	505	—	—	—	411
-MT	665	—	610	—	—	533	503	—	—	—	411
-CS	668	—	610	—	560	533	505	475	450	—	410

【0040】

* * 【表8】(3).黄色(Y)

ML-CNA	668.5	609.0	—	534.0	—	497.0	—	—	—	410.0
-PCA	668.5	—	—	534.0	—	—	—	448.5	—	410.5
-CS	668.5	610.0	—	534.5	504.0	—	471.0	—	—	410.0
CL-CNA	668.5	611.0	567.0	533.0	—	—	—	—	—	410.0
SP-CNA	662.5	611.0	567.0	533.0	503.0	—	—	—	—	412.5

【0041】

※20※ 【表9】(4).黄褐色(DY)

ML-CNA	668.5	610.0	—	534.0	504.0	473.5	—	—	410.0
-PCA	668.5	609.5	—	534.5	497.5	473.0	—	—	410.0
-CS	668.5	609.0	—	534.0	502.0	—	—	—	409.5
CL-CNA	668.5	610.0	567.5	534.0	—	—	—	—	412.0
SP-CNA	666.5	610.0	567.5	534.0	—	476.0	—	—	410.5
-MT	668.5	611.5	562.0	533.5	—	476.0	—	—	410.0

【0042】

★ ★ 【表10】(5).BGR

ML-BG	668.5	608.5	—	534.0	500.0	473.5	—	—	410.5
HO-BG	667.5	610.0	—	532.5	499.0	473.0	—	—	410.5
CL-BG	668.5	609.0	—	533.5	497.0	473.0	—	—	410.0
SP-BG	668.0	610.0	—	530.5	499.0	473.5	—	—	409.5

【0043】

☆ ☆ 【表11】(6).深緑色(DG)

ML-CNA	662.0	—	614.5	—	535.0	—	454.5	430.5	412.5
-PCA	662.5	—	613.0	—	534.5	—	454.0	429.0	412.0
-MT	664.0	645.5	612.0	—	534.5	—	452.5	429.5	414.0
-GXL	662.0	—	614.5	—	535.0	—	454.5	430.5	412.5
-GLA	662.0	—	614.5	580.5	534.5	—	452.5	430.5	410.0
SP-CS	662.5	—	614.5	578.0	534.0	503.0	—	430.0	410.5
HO-CNA	662.0	—	614.5	580.0	534.5	—	454.0	430.5	412.0

【0044】この結果をみると、クロロフィルa型化合物は混合物であることを示すように吸収極大の位置が羅列されているだけで、規則性がない。活性化物ではY G、Yのスペクトルには規則性が乏しいが、BG、DY、DG、BGRでは各々独自の吸収極大を数個ずつ持ち、一定のパターンを示す。これにより、これらのものが一定の化学構造を持った化合物であることが示され、これを文献に示す既知のクロロフィルa又はbのパターンと比較してみると、明らかにa及びbとは異なった構造を持つもので、これら活性化物が今までに知られてい

なかったクロロフィル化合物であることを示している。従ってBG、DY、BGR、DGはクロロフィルa、bなどとは異なった構造を持ち、しかも強い生理活性を持ったクロロフィル化合物であることが明らかになった。DY、Yにも生理活性は見られるが、吸収極大の位置が植物、藻類の種類によって変わり、一定した化学構造のものではないことが分かる。

【0045】実施例2、活性クロロフィルの効果確認のための蚕の飼育試験。

1. 蚕の飼育試験に使用した活性クロロフィルは、ま

17

ず、クロロフィルa型化合物を作り、これを前記したようにセルロースカラムクロマトで活性クロロフィル(BG、DY、DG、BGR、YG、Y)に分離し、これを飼料に混合使用した。

2. 多糖類の作成は、原料として脱脂大豆粉末を使用し、この脱脂大豆粉末を有機酸を含む水と加熱し、冷却後メタノールを加え、抽出物を濾過して取り、洗浄、乾燥することにより得た。

3. 検体となる活性クロロフィル、又は活性クロロフィル及び多糖類は夫々秤量して基本飼料に混合し、これを飼育飼料とした。

【0046】試験を行った活性クロロフィルは種々の原料、例えばハウレンソウ、クワ、日本茶、稲などの植物、クロレラ、スピルリナなどの藻類を原料にして作られたが、いずれの原料、活性化剤を用いても生成される活性クロロフィルは、スペクトルを同一にしたBGであり、DYであるので、検体としては、6種類の活性クロロフィル(BG、DY、DG、BGR、YG、Y)を使用した。なお、検体の表示方法は次のようにした。即ち、例えばBG-ML-CNAは桑葉(ML)をビタミンCナトリウム塩(CNA)で処理して得られたクロロフィルa型化合物をクロマト吸着して得られたBGである。以下同様で、BGR-ML-CNA-BGでは得られたBG-ML-CNAを再吸着して得られたBGRである。脱脂大豆を原料にした多糖類を以下PSと表すことにした。

【0047】4. 本実験で蚕の飼育に使用した基本飼料は次のようなものである。

濃粉(ビタミン、薬剤)	9.85g
馬鈴薯澱粉	14.00g
脱脂大豆粉末	50.46g

18

粉末寒天	14.40g
セルロース粉末	10.10g
VC-Na	0.597g
β-シトステロール	0.597g
合計	100.004g
【0048】	

濃粉

イノシトール	10.00g
パントテン酸カルシウム	0.20g
ビタミンB ₆ =	0.04g
ニコチン酸アミド	0.12g
クロロマイセチン	0.04g
オキシキノリン	0.08g
ソルビン酸	4.00g
馬鈴薯澱粉	115.52g
合計	130.00g

【0049】蚕品種としては「錦秋×鐘和」または「春嶺×鐘月」を使用した。この蚕種を70%メタノールで洗浄したのち、25℃で10日間放置し、ふ化したものを掃き立てに供した。この飼料5.0gに水8.2mlを加えてよく練合し、これを飼育容器に入れて100℃、40分間滅菌を行い、冷却後これに滅菌済みのふ化した蠶蚕を入れて掃立てを行った。掃き立てた飼育容器は28℃の恒温槽に移し、放置して飼育を行い、掃き立て後、7日目に除沙、停食し、8日目に調査して眠起率、3令起蚕体重を測定した。眠起率とは、ふ化して掃き立てた蠶蚕数に対する3令起蚕数を%で表したもので、発育の揃いの程度を表すものである。得られた飼育成績結果を表12、表13に示す。

30 【0050】

【表12】

	眠起率 (%)		3令起蛋体重 (mg)	
	-	+PS	-	+PS
BG-ML-CNA 60mg	91.6	96.2	35.6	36.8
" -ML-PCA "	89.3	93.8	35.2	36.3
" -ML-MT "	88.5	94.7	33.7	34.2
" -HO-CNA "	88.7	93.3	32.2	34.8
" -HO-CS "	87.4	94.1	32.8	33.7
" -CL-CNA "	87.3	93.6	33.4	34.1
" -CL-CS "	88.8	92.7	32.7	33.3
" -SP-CNA "	85.9	94.7	34.5	34.6
" -SP-MT "	86.7	94.3	33.0	33.7
" -JT-CNA "	87.5	92.8	33.6	33.2
" -ST-CNA "	88.3	91.2	34.7	35.4
" -CHR-CNA "	86.5	90.7	34.2	34.6
" -ML-CA "	87.1	92.8	32.4	34.1
" -ML-GXL "	87.7	93.5	34.5	35.8
" -ML-GLA "	89.2	94.0	33.8	34.9
" -ML-GXA "	88.3	93.7	34.4	35.7
BGR -ML-GXL-BG "	85.5	92.5	33.1	34.2
" -ML-CNA " "	87.2	95.4	33.6	35.6
" -ML-GLA " "	88.3	95.2	34.9	35.4
" -CL-CNA " "	88.6	92.7	31.5	33.8
" -HO-CNA " "	89.9	91.3	33.0	34.1
" -SP-CNA " "	85.3	92.4	31.8	33.2
DG-ML-CNA "	87.5	93.3	32.4	34.9
" -ML-GXL "	86.8	92.9	33.6	34.7
" -HO-CNA "	87.3	92.7	32.1	34.0
" -SP-CS "	88.1	93.6	32.8	33.7

【0052】

* * 【表13】

	眠起率 (%)		3令起蛋体重 (mg)	
	-	+PS	-	+PS
DY-ML-CNA 60mg	89.2	94.2	33.6	35.8
" -ML-CS "	88.4	93.1	32.4	35.1
" -CL-CNA "	89.3	93.6	32.8	33.7
" -SP-CNA "	87.7	91.8	32.2	34.1
" -SP-MT "	86.9	92.1	32.4	33.6
YG-ML-CNA "	83.4	84.0	30.3	30.2
" -ML-PCA "	83.0	84.5	29.4	30.7
" -ML-CS "	82.1	83.9	29.1	30.3
" -HO-CNA "	81.8	83.0	28.6	30.6
" -HO-PCA "	82.5	83.4	28.7	29.8
" -CL-CNA "	80.3	81.6	29.5	30.4
" -CL-MT "	81.5	81.8	29.0	30.9
" -SP-PCA "	82.7	84.1	28.5	29.4
" -SP-MT "	82.4	83.9	28.7	29.7
Y -ML-CNA "	83.8	84.2	29.3	30.1
" -CL-CNA "	82.9	83.7	28.8	29.9
" -SP-CNA "	83.2	84.9	28.3	29.5

【0053】この飼育試験の結果をみると、活性クロロフィルには十分な成長効果が認められ、桑葉と変わらない成長効果も確認された。又、多糖類との共存により眠起率が良くなり、体重も活性クロロフィル単独よりも良くなる傾向が見られる。活性クロロフィル6種類には全て成長効果が見られ、その中ではBGが良いようであるが、BGR、DG、DYと比べて差は見られない。但

し、YG、Yの効果は若干落ちる。従って、BG、DG、BGR、DYなどの活性クロロフィル単独、もしくは多糖類とともに飼料に混合し、動物を飼育することにより、その成長を良くすることが期待できる。

【0054】

【発明の効果】以上のように本発明によれば、植物葉または藻類から水と任意に混和しうる有機溶媒を用いて粗

21

クロロフィル化合物を抽出し、この粗クロロフィル化合物に活性化剤として、ビタミンC、フェノール酸、フェノールアルデヒド、含硫化合物、ジオキサン、ケト酸、ジケトン、ジアルデヒド、脂肪酸、オキシ酸などを加えてクロロフィルa型化合物を生成し、このクロロフィルa型化合物をクロマトなどの分割手段により活性クロロフィル化合物に単離することを特徴とするものであるか

22

ら、安価に入手できる植物葉又は藻類から容易にクロロフィルa型化合物を生成し得ると共に、このクロロフィルa型化合物を単離させて得られた活性クロロフィル化合物を多糖類などと混合して飼料を作成し、この飼料を用いることによって動物体内のコレステロール値の上昇を防ぎ、成長促進、体重増加などの優れた生理活性効果の発現を期待できるものである。